

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

①1 N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

2 529 892

②1 N° d'enregistrement national :

82 12100

⑤1 Int Cl³ : C 07 F 7/10; C 07 H 21/00.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 9 juillet 1982.

③0 Priorité

④3 Date de la mise à disposition du public de la
 demande : BOPI « Brevets » n° 2 du 13 janvier 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
 rentés :

⑦1 Demandeur(s) : **TRANSGENE SA. — FR.**

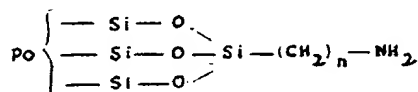
⑦2 Inventeur(s) : Vipin Kohli, Alain Balland et Jean-Pierre
 Lecocq.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf.

⑤4 Nouveau support pour la synthèse des polynucléotides, en particulier par la méthode triester et procédé pour sa
 préparation.

⑤7 La présente invention concerne, à titre de support dans la
 synthèse des polynucléotides par la méthode triester, une silice
 HPLC modifiée pour porter les groupements de formule :



Po schématisant le support HPLC et *n* ayant une valeur de 1 à
 100.

FR 2 529 892 - A1

La présente invention concerne un nouveau support destiné à la synthèse des polynucléotides et un procédé pour l'élaboration de ce support.

Il existe diverses synthèses chimiques des déoxyoligonucléotides, ces synthèses se divisent en trois groupes :

- la méthode au phosphodiester,
- la méthode au phosphotriester,
- la méthode au phosphite.

De façon à augmenter la vitesse de ces différentes synthèses, on a eu recours à divers supports solides.

La synthèse en phase solide permet d'assembler de très petites quantités de blocs de nucléotides en écartant les risques de pertes de produits intermédiaires lors des différentes étapes de purification qui sont nécessaires dans la synthèse des déoxypolynucléotides par des procédés dits "en solution".

Dans les procédés en phase solide, le nucléoside est fixé sur un support solide par une liaison covalente et la chaîne oligonucléotide est construite sur le support solide. A la fin de la synthèse, l'oligonucléotide est séparé du support par

coupure chimique et finalement purifié par les techniques chromatographiques après avoir éliminé les différents groupes protecteurs.

5 Il existe de nombreux procédés de synthèse en phase solide pour la synthèse des oligonucléotides. Traditionnellement, le problème le plus important dans le cadre des procédés utilisant un support tient à la nature même du support. De nombreux polymères ont été
10 utilisés dans ce type de synthèse et se sont tous révélés insuffisants pour différentes raisons. En particulier, les nucléotides activés diffusent très lentement à l'intérieur de tels supports et il se produit une absorption irréversible de certains réactifs sur le polymère ; enfin, les polymères organiques ont tendance
15 à gonfler de façon excessive.

Bien entendu tous ces problèmes pourraient être écartés en utilisant un support inorganique. Sur un tel support, les solvants et les réactifs peuvent être aisément éliminés et bien entendu il s'agit d'un
20 support qui ne gonfle pas.

Un tel support a déjà été proposé pour la synthèse des déoxypolynucléotides par H. Köster (Tetr. Let., 1527-1530, 1970). Ce support était mis en oeuvre dans le cadre de la méthode au phosphodiester.

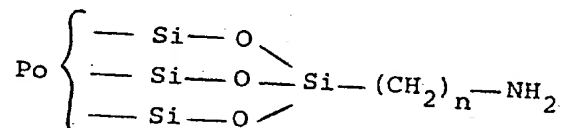
25 Récemment, des supports inorganiques ont été utilisés par Caruthers et al. pour construire des chaînes oligonucléotides en utilisant la méthode au phosphite qui utilise une phosphorylation à - 78°C (M.D. Matteucci et al. Tetr. Let., 21, 719-722, (1980)).

30 De façon générale, on peut dire que si les supports inorganiques présentent de nombreux avantages par rapport aux supports organiques, ils présentent

en général un inconvénient important qui est de ne permettre qu'une charge limitée de nucléoside de départ, ce qui, bien entendu, limite les quantités d'oligo-nucléotides qui peuvent être préparées.

C'est dans le cadre d'études portant sur la seconde des méthodes utilisables pour la synthèse des déoxynucléotides, c'est-à-dire la méthode au phosphotriester, que la Demanderesse a été amenée à mettre au point un nouveau support inorganique présentant des caractéristiques tout à fait inattendues par rapport à ce qui était déjà connu dans la technique antérieure.

Il s'agit, à titre de support dans la synthèse des polynucléotides, d'une silice HPLC, notamment une silice Porasil modifiée pour porter les enchaînements de formule :



dans laquelle Po schématise le support Porasil et n a une valeur de 1 à 100.

Par "silice HPLC" (high pressure liquid chromatography), on entend désigner une silice ayant des caractéristiques physico-chimiques, en particulier des dimensions et des capacités de fixation et de sorption, qui la rendent apte à être utilisée en chromatographie en phase liquide, en particulier sous haute pression.

La silice Porasil utilisée est vendue par la Société WATERS. Il s'agit d'une silice pour HPLC ayant un diamètre particulaire compris entre 37 et 75 μ qui

a été modifiée pour créer des groupes NH_2 sur la silice par le procédé décrit de façon générale par P. Tundo et al. (J. Am. Chem. Soc., 101, 22, October 24, 1979).

5 Pour obtenir le support selon la présente invention, on fait réagir la silice Porasil avec un aminoalkyle-trialcoxysilane, à reflux dans un solvant.

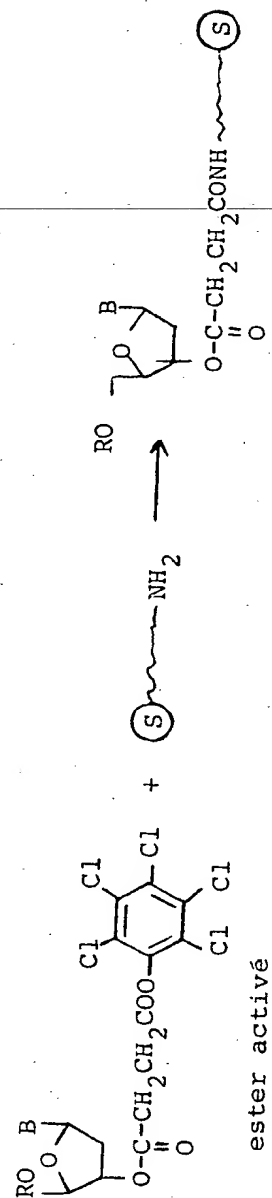
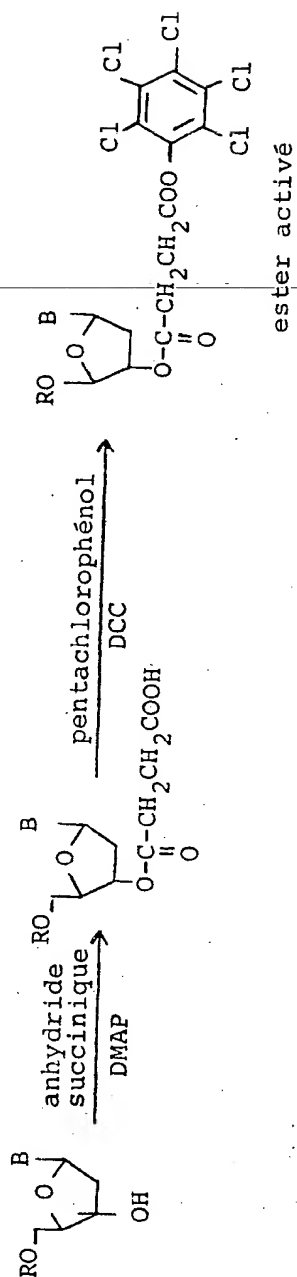
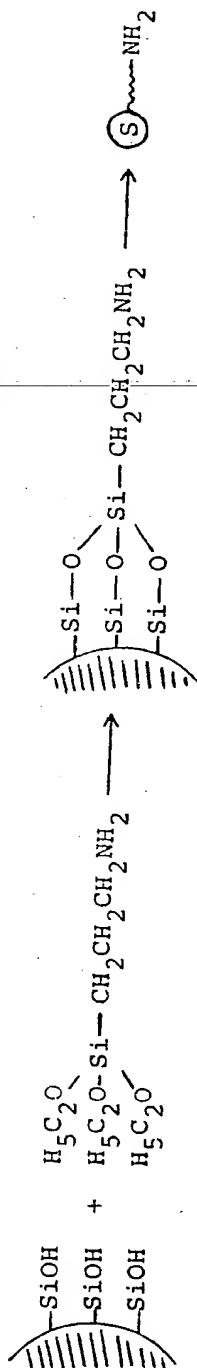
10 Il est ensuite nécessaire de bloquer les groupes Si-OH restant sur la silice, ce qui peut être effectué par traitement du produit obtenu avec du chlorure de triméthylsilyle, par exemple en solution pyridinique. Ce traitement permet un blocage efficace des groupes silanol restants et le support ainsi obtenu peut être utilisé dans la synthèse des poly-nucléotides.

15 Afin de faciliter la compréhension des expériences qui vont suivre, on donnera ci-après un schéma de la préparation du support solide sur lequel on a fixé le premier nucléoside.

20

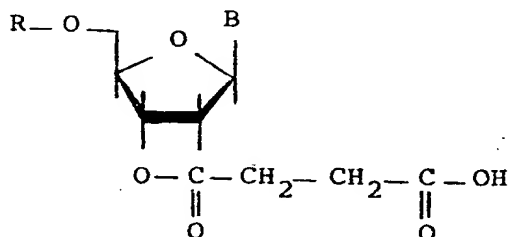
25

Préparation du support solide



Sur ce schéma, on a représenté schématiquement la résine Porasil par ses groupes silanols situés en surface. C'est sur ces groupes silanols que l'on fait réagir la triéthoxysilylpropylamine afin d'obtenir le support selon la présente invention.

Dans un deuxième temps on prépare le déoxynucléoside activé, comme cela est décrit en particulier dans Itakura et al. (Nucl. Ac. Res., 8, 22, 5473, 1980). Les 5'-diméthoxy N-acyl déoxynucléosides sont traités avec l'anhydride succinique en présence de N,N-diméthylaminopyridine en solution dans le diméthylformamide. Le succinate de déoxynucléoside résultant a la formule suivante :



dans laquelle R est le radical trityle, monométhoxytrityle et diméthoxytrityle et B est N-acyle adénine, guanine, cytosine ou thymine.

Le succinate ainsi obtenu est condensé avec le pentachlorophénol en utilisant le DCC à titre d'agent de condensation.

Cet ester de pentachlorophénol peut être utilisé comme nucléoside activé.

Le nucléoside ainsi activé est traité avec le support préparé précédemment en solution dans le diméthylformamide en utilisant la triéthylamine comme catalyseur pendant 20 à 24 heures.

On obtient ainsi le premier nucléoside fixé sur le support.

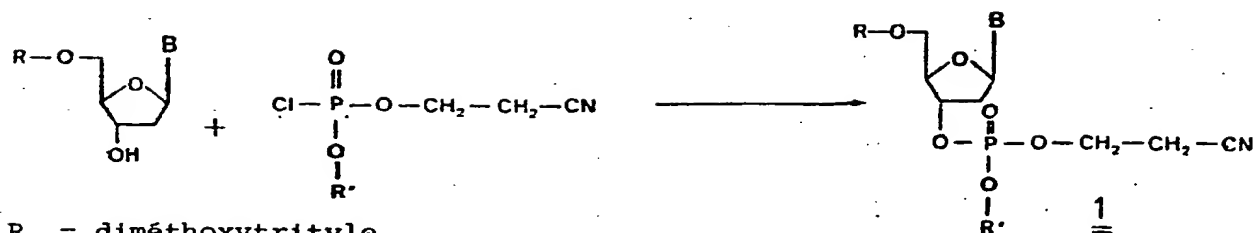
Les différentes étapes ci-après décrivent la synthèse de la chaîne oligonucléotidique :

5 a) Déprotection de la fonction 5'OH par traitement au bromure de zinc ; L'utilisation d'un acide de Lewis supprime les réactions secondaires de dépurination (Kohli V., Blocker H., Koster H., 1980, Tetrahedron Lett., 21, 2683-2686).

10 b) Condensation d'un nucléotide ou dinucléotide (sel de triéthylammonium) par une liaison phosphotriester sur le nucléoside fixé au support. Les condensations sont effectuées à l'aide d'un agent de condensation : le mesitylène sulfonyle nitrotriazole (MSNT).

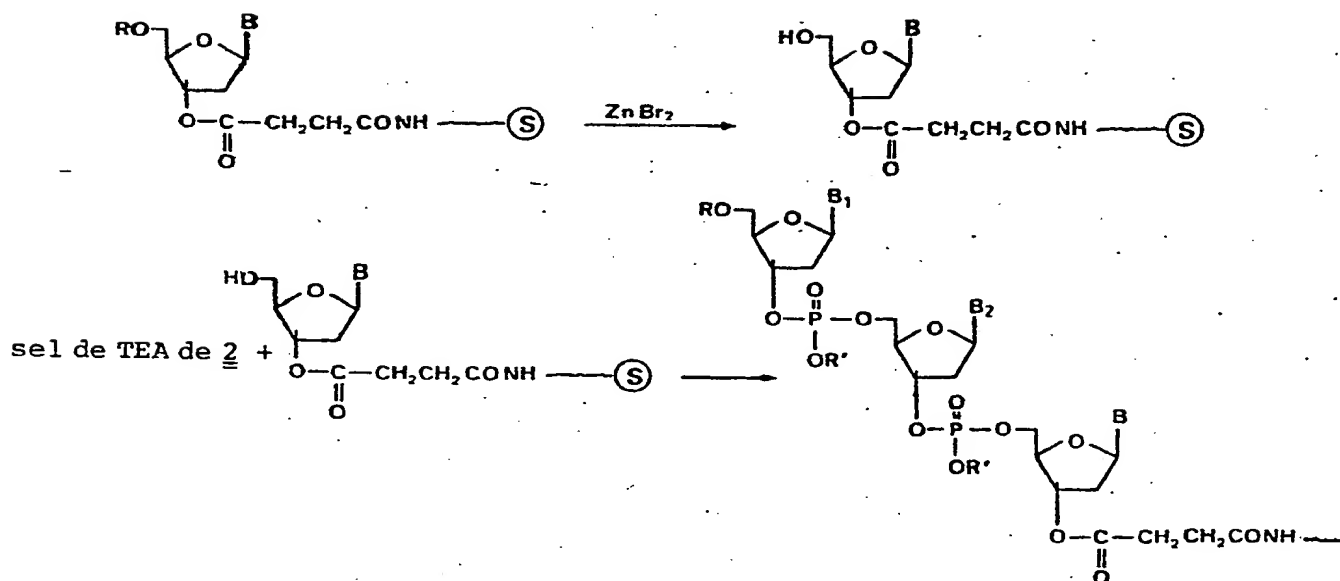
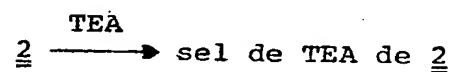
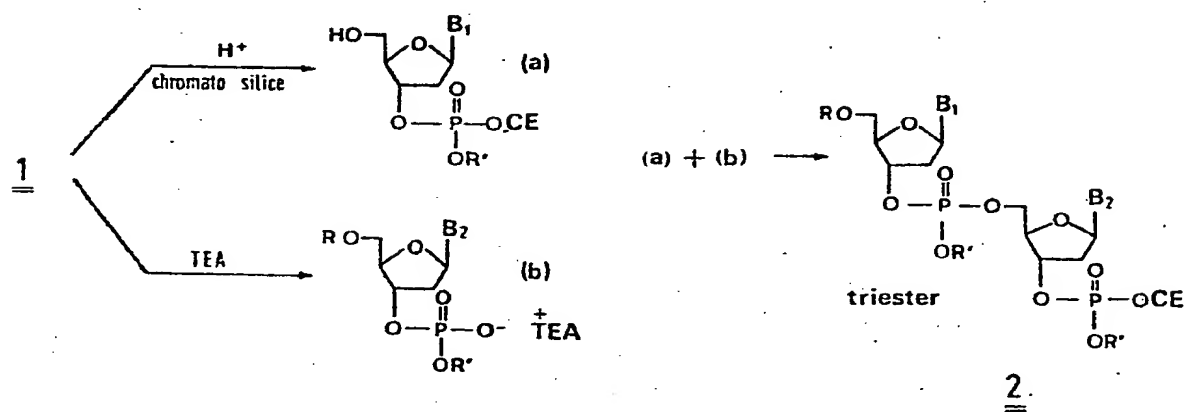
15 c) Blocage des groupes 5' hydroxyles qui n'ont pas réagi avec l'anhydride acétique de manière à éviter les séquences tronquées.

20 d) Traitement par ZnBr_2 pour libérer le 5' hydroxyle. Un Nouveau dinucléotide peut être alors additionné.



R = diméthoxytrityle

R' = o-chlorophényle



Après la dernière étape de condensation, l'oligonucléotide entièrement protégé qui est lié au support par une liaison covalente est soumis à une réaction de déprotection de façon à libérer les groupes bloqués durant la croissance de la chaîne.

Ainsi l'action du para-nitrobenzaldoxime N,N,N,N-tétraméthylguanidinium assure la déprotection des liaisons phosphodiester internucléotidiques et une hydrolyse alcaline libère les groupes protégés des fonctions aminohétérocycliques et coupe l'oligonucléotide du support inorganique, ensuite une hydrolyse acide des groupes diméthoxytrityles libère la fonction alcool en position 5'.

Les différents groupes de protection sont éliminés par extraction avec des solvants organiques, l'oligonucléotide lui-même pouvant être purifié par chromatographie liquide sous haute pression.

Avec le support selon la présente invention, on a pu synthétiser les déoxyoligonucléotides suivants :

20	5' - d (CGAGCT)	6
	5' - d (GATCGTAC)	8
	5' - d (TGTTTCCTATT)	11
	A	
	5' - d (CACCA CACTCATA)	Mix 14
	G	
	5' - d (CTGCTCTGACAACCT)	15
25	5' - d (TGATTCTGCTCTGACAACCT)	21
	5' - d (ATGAAGTAAAAGTTCCTTAGGATTT)	25
	5' - d (CTGTTAATGAAGTAAAAGTTCCTTAGGATTT)	31

Les exemples suivants sont destinés à illustrer le procédé selon la présente invention mais ne la limitent évidemment en aucune façon.

Exemple 1Préparation du support selon l'invention

On ajoute à 10 g de silice Porasil B 15 ml de triéthoxysilylpropylamine dans 50 ml de toluène et le mélange est porté au reflux pendant 7 heures. Le mélange est refroidi. La silice est filtrée et lavée avec deux fois 100 ml de pyridine.

On ajoute alors 11 ml de chlorure de triméthylsilyle et le mélange est agité pendant 4 heures à la température de la pièce. La silice est filtrée, lavée avec 3 fois 50 ml de pyridine et 3 fois 50 ml d'éther éthylique puis on sèche dans un dessiccateur pour obtenir une silice portant des groupes amines libres.

6 g de la silice ainsi modifiée sont traités avec 1 g de triéthylamine dans 10 ml de pyridine pendant 2 à 3 heures. L'excès de triéthylamine est éliminé par coévaporation avec la pyridine ou par filtration et lavage avec le dichlorométhane et l'éther éthylique.

La silice modifiée ainsi obtenue est séchée en dessiccateur et utilisée pour être chargée par le déoxynucléotide activé dont on va maintenant décrire la préparation.

Exemple 2Préparation du déoxynucléotide activé

- Synthèse du monosuccinate de 3'(5'-O-diméthoxytrityl) déoxynucléoside :

Il s'agit là d'un procédé général pour l'ensemble des nucléosides, c'est pourquoi on décrira uniquement la préparation du monosuccinate de 3'(5'-O-diméthoxytrityl) thymidine.

5,45 g de 5'-O-diméthoxytritylthymidine anhydre (10 mmoles) sont dissous dans 40 ml de pyridine contenant 1,83 g de diméthylaminopyridine (15 mmoles) et 1,50 g d'anhydride succinique (15 mmoles).

Le mélange est agité à la température de la pièce pendant une nuit et concentré jusqu'à la consistance d'une gomme qui est reprise dans CHCl_3 . La solution de CHCl_3 est lavée avec Na_2HPO_4 et H_2O puis par une solution aqueuse 4 mmolaire d'acide citrique.

La couche chloroformique est séchée, concentrée jusqu'à la consistance d'une gomme et purifiée sur une petite colonne de gel de silice en utilisant 5 % d'éthanol dans le chloroforme. Les fractions purifiées sont rassemblées et précipitées dans l'éther de pétrole.

- Synthèse du pentachlorophényl 3'-(5'-O-diméthoxytrityl thymidityle)

A 1,29 g du mélange du monosuccinate précédent (2mmoles) et de 590 mg de pentachlorophénol (2,2 mmoles) dans 15 ml de diméthylformamide, on ajoute 620 mg de DCC (3 mmoles). Le mélange réactionnel est agité à la température de la pièce pendant 20 heures. Après filtration le filtrat est évaporé et le résidu est dissous dans le benzène pour éliminer les dérivés d'urée. La solution benzénique est évaporée et l'ester activé est dissous dans une petite quantité de benzène. Le produit est précipité par l'addition goutte à goutte dans la solution de benzène de 400 ml de pentane. Les précipités obtenus sont filtrés, séchés et utilisés sans purification supplémentaire. Le rendement est de 1,50 g (84 %).

Exemple 3

Préparation du support modifié portant le nucléoside

Un mélange de 5 g de silice aminée obtenue à l'exemple 1 et de 3,6 g de l'ester activé de l'exemple 2 (4 mmoles) et de 0,44 g de triéthylamine (4,4mmoles)

dans 30 ml de DMF est agité à la température de la pièce pendant 20 heures. Le mélange réactionnel est filtré et la résine est lavée avec du DMF et de la pyridine puis traité avec du phénylisocyanate (10 % en solution) dans la pyridine (35 ml) pendant 3 heures pour bloquer les fonctions amino libres.

Le mélange est filtré et la résine est lavée avec de la pyridine et du méthanol puis séchée. Le rendement est de 5,6 g.

La quantité estimée de thymidine fixée sur la résine est de 0,20 mmole par gramme évaluée par spectroscopie de la fonction diméthoxytrityle et par la quantité de thymidine libérée de la résine.

Un procédé de détermination quantitative de la charge du premier nucléoside sur le support selon la présente invention est effectué de la façon suivante :

1°) on pèse précisément 1 mg de support chargé sec.

2°) On ajoute 1 ml d'acide toluène sulfonique 0,1 M dans l'acétonitrile.

3°) On mesure l'absorbance à 498 nm. Si l'absorbance approche 2,0 alors on dilue et on effectue une nouvelle lecture. La charge peut être calculée de la façon suivante :

$$\text{Charge en } \mu\text{moles/g} = \frac{(\text{Abs } 498) (\text{facteur de dilution})}{\text{Poids silica gel (mg)}} \times 14,3$$

De cette façon on obtient pour première charge avec les supports selon la présente invention entre 200 et 215 $\mu\text{moles/g}$, ce qui est considérable par rapport à toutes les données existantes concernant les supports inorganiques, ces résultats étant voisins de ceux obtenus avec les supports organiques.

Une telle charge initiale permet de travailler avec des quantités de support chargé en nucléoside de l'ordre de 50 mg pour la préparation des chaînes de déoxynucléoside.

5 Exemple 4

Préparation du phosphate de 5'-diméthoxytrityle
N-acyle déoxynucléoside 3'-chlorophényl-β-
cyanoéthyle

10 Les différents blocs sont synthétisés en grandes quantités par traitement des 5'-diméthoxytrityle N-acyle déoxynucléosides du commerce avec le β-cyanoéthyle monochlorodate de O-chlorophényle en utilisant le N-méthylimidazole comme catalyseur. Le procédé de préparation du monochloridate et des triesters sont décrits ci-après :

15 - Synthèse du β-cyanoéthyle phosphomono-
chloridate de O-chlorophényle

20 A 100 mmoles d'une solution de O-chlorophényle phosphodichloridate dans 20 ml de THF refroidi à -70°C on ajoute 100 mmoles de cyanoéthanol et 100 mmoles de triéthylamine dans 20 ml de THF goutte à goutte pendant environ 1 heure et demie sous agitation.

25 Le mélange est réchauffé à la température de la pièce pendant 1/2 heure après que la solution ait été ajoutée.

30 300 ml de toluène sont ajoutés et le chlorhydrate de triéthylammonium est filtré. Le filtrat est évaporé sous vide jusqu'à consistance d'une huile qui est utilisée sans purification complémentaire. Le produit est stocké à -20°C.

- Procédé général pour la synthèse de
5'-DMTr-N-acyle déoxynucléosides 3'-
phosphotriester

A une solution refroidie au bain de glace de 5'-DMTr-N-acyle déoxynucléoside (0,5 mmole) et de 1-méthylimidazole (2,2 mmoles) dans 2 ml d'acétonitrile

anhydre on ajoute une solution de 2 mmoles de β -cyano-éthyle phosphomonochloridate de O-chlorophényle dans 0,5 ml d'acétonitrile sous agitation pendant 5 minutes.

5 Le mélange réactionnel est trempé avec 2 ml d'un tampon phosphate pH 7. La phase organique est évaporée et le résidu est réparti entre 10 ml de chloroforme et 10 ml d'eau. La couche chloroformique est lavée avec une solution de dihydrogéo-phosphate de sodium 0,1 M trois fois, puis deux fois avec de l'eau.

10 Le dérivé déoxyguanosine correspondant nécessite l'addition d'une quantité supplémentaire de monochloridate. Ceci est dû à la phosphorylation de la position O⁶ de la guanine. Toutefois, la partie phosphoryle en position O⁶ peut être éliminée par
15 agitation du triester avec du silica gel 60 pendant une nuit dans une solution de dichlorométhane contenant quelques gouttes de pyridine pour éviter une détritylation. Le rendement global est de 60 à 70 % de triester pur après chromatographie sur une petite colonne.

20 Pour obtenir les phosphates de 5'-diméthoxytrityle N-acyle déoxynucléoside 3'-o-chlorophényle triéthylammonium, les triesters mentionnés précédemment sont traités avec la triéthylamine dans une solution pyridine-acétonitrile pendant 1 heure. Le procédé est
25 décrit par Gait M.J., Sheppard R.C., Nuc. Ac. Res. (1977) 4, 1135-1158.

Les sels correspondants sont obtenus par précipitation dans l'éther de pétrole (40-60°C).

30 Pour la synthèse par étape des déoxypolynucléotides on utilise soit les sels de triéthylammonium du mononucléotide ou les blocs de dinucléotides correspondants. Les blocs de dinucléotides sont préparés par le procédé ci-après.

1 mole de 5'-diméthoxytrityle N-acyle déoxynucléoside est détritylée à 0°C avec de l'acide benzène-sulfonique à 2 % dans un mélange chloroforme-méthanol (7-3) et la réaction est contrôlée par chromatographie en couche mince. Lorsque la détritylation est complète, le mélange réactionnel est trempé avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5 %. La couche de chloroforme est concentrée, séchée par évaporation répétée avec de la pyridine anhydre et on ajoute au produit obtenu 1,1 mmole du phosphate de 5'-diméthoxytrityle N-acyle déoxynucléoside 3'-o-chlorophényl triéthylammonium désiré, suivi par 3 mmoles de mésitylènesulfonyle nitrotriazolide. Après 30 minutes la réaction est trempée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. Le produit est extrait dans le chloroforme. La couche chloroformique est lavée avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre et chromatographiée sur une petite colonne de chromatographie. Le rendement global est de 60 à 80 % des nucléotides purs. Les sels de triéthylammonium du dimère sont préparés de la même façon que cela a été décrit pour les monomères.

Exemple 5

Synthèse de TGTTTCCTATT

100 mg de silice Porasil B chargée avec un 3'-succinate de 5'-OH déoxynucléoside ayant 212 µmole/g de silice sont placés dans une colonne en verre en solution pyridinique. On ajoute alors dans cette colonne 100 µmoles de : DMTr - A ^{B2} T [⊖] TEA [⊕] et 1 mmole

$$\begin{array}{ccccc} & & \text{P} & \text{P} & \\ & & | & | & \\ \text{PhCl} & & \text{ClPh} & & \end{array}$$
de mésitylène sulfonyle nitrotriazole dans 1 ml de pyridine sèche. Après 1 heure à la température de la

pièce, le support solide est lavé avec de la pyridine. Pour bloquer les groupes hydroxyles n'ayant pas réagi, le solide est traité avec la solution de protection suivante pendant 25 minutes :

- 5 20 mmoles N,N-diméthylaminopyridine,
 10 mmoles d'anhydride acétique,
 50 ml de pyridine.

Ce réactif bloque les groupes hydroxyles n'ayant pas réagi.

- 10 Le solide est lavé avec du dichlorométhane. Les groupes 5'-diméthoxytrityle sont éliminés par traitement avec une solution saturée de bromure de zinc dans un mélange dichlorométhane-isopropanol, (7-3). Le support est alors lavé avec du dichlorométhane et du DMF. Il est ensuite séché par passage de pyridine sèche à travers la colonne. Ce cycle, à savoir :

- 15 a) condensation 1 heure,
 b) lavage avec de la pyridine,
 c) protection,
20 d) lavage,
 e) détritylation,
 f) trempage avec du DMF,
 g) séchage avec de la pyridine,

- est répété pour les blocs de dinucléotide CA, AC, GC
25 et TG en utilisant 100 μ moles de chaque dimère et 1 mmole de MSNT dans 1 ml de pyridine anhydre. La déprotection finale du déoxyoligonucléotide à partir du support solide et l'élimination des différents groupes de protection ainsi que la purification par HPLC seront
30 décrites ci-après.

Exemple 6Déprotection des oligonucléotides

2,5 μ moles de substrat (support + oligonucléotide) sont dissoutes dans 600 μ moles d'un mélange dioxane-eau (1-1). ON ajoute 0,3 mmole de sel N,N,N,N-tétraméthylguanidium de syn-p-nitrobenzaloxine pendant une nuit à la température de la pièce. Le jour suivant le mélange est séché et dissous dans l'ammoniaque concentré 5 heures à 50°C puis une nuit complète à la température de la pièce.

Le produit est filtré pour éliminer le support, concentré sous pression réduite, dissous dans 5 ml de tampon bicarbonate de triéthylammonium 0,1 M et lavé plusieurs fois à l'éther.

Le DMTr-DNA contenu dans la phase aqueuse peut être alors injecté sur colonne HPLC C₁₈.

Après purification, le DMTr-DNA est totalement déprotégé dans un mélange acide acétique-eau 80-20 une demi-heure à température ambiante.

L'acide acétique est éliminé par extraction à l'éther, la phase aqueuse est lyophilisée. L'oligonucléotide entièrement déprotégé peut être repurifié si nécessaire sur colonne HPLC C₁₈.

Exemple 7Purification HPLC

DMTr-DNA colonne Waters C₁₈ - 10 μ avec les gradients suivants :

- Solvant A : acétate de triéthylammonium tampon 0,1 M, pH 6,5, acétonitrile 20 %,
- Solvant B : acétate de triéthylammonium tampon 0,1 M, pH 6,5, acétonitrile 30 %.

DNA déprotégé

Même tampons avec gradients acétonitrile 5 - 20 %.

Conclusion générale

La méthode décrite ici est donc l'application de la synthèse triester des oligonucléotides sur un support inorganique du type silice.

5 Cette procédure a été employée avec succès pour la production en routine d'oligonucléotides dont différents exemples ont été donnés.

Les principaux avantages de cette procédure sont :

10 1) L'utilisation d'intermédiaires stables qui peuvent être préparés en grande quantité et stockés. Ces intermédiaires, utilisés en excès, peuvent être récupérés après synthèse et réutilisés après repurification.

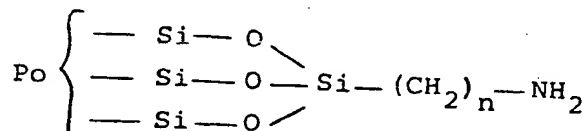
15 2) L'utilisation d'un support inorganique, non soluble, possédant de bonnes qualités mécaniques et autorisant une charge élevée en premier nucléoside. Un tel support est compatible avec la technique phosphotriester :

- 20 - détritylation avec le bromure de zinc, réactif de choix qui ne peut pas être utilisé sur support inorganique de type poly-acrylamide (GAIT) ;
- 25 - activation des sels de triéthylammonium par le MSNT dans un solvant polaire (pyridine) ;
- utilisation de l'anhydride acétique pour protéger les 5' hydroxyles restés libres.

REVENDICATIONS

1) A titre de support dans la synthèse des polynucléotides, une silice HPLC modifiée pour porter les groupements de formule :

5



10 Po schématisant le support HPLC et n ayant une valeur de 1 à 100.

2) Support selon la revendication 1, caractérisé en ce que les autres groupes silanol de la silice sont bloqués.

15 3) Support selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la silice HPLC est une silice Porasil.

4) Support selon la revendication 3, caractérisé en ce que la silice Porasil est une
20 silice Porasil B.

5) Support selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le diamètre des particules est compris entre 37 et 75 μ .

6) Procédé de préparation d'un support selon
25 l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on fait réagir une silice HPLC avec un aminoalkyl-trialcoxysilane.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la réaction est conduite au reflux
30 dans le toluène.

8) Procédé selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisé en ce qu'après le traitement avec le dérivé de silane le produit obtenu est traité par le chlorure de triméthylsilyle.

5

9) Application du support selon l'une des revendications 1 à 5 dans la synthèse au phosphotriester des polynucléotides.

THIS PAGE BLANK (USPTO)
